

## Untersuchungen zum Nachweis von Antibiotika im Hühnerei mit dem biologischen Hemmstofftest<sup>\*)</sup>

Von Gerlinde Steiner

Kode: Lebensmittelhygiene, Geflügel, Hühnerei, Antibiotika, Hemmstoffnachweis.

(Angenommen am 2. August 1989)

### Zusammenfassung

Für den biologischen Nachweis der Antibiotika Erythromycin, Oxytetracyclin und Penicillin im Hühnerei und in Eiprodukten wurden verschiedene Teststämme und Nährmedien auf ihre Eignung geprüft. Der Agarlochtest mit Dialysemembran erwies sich als geeignete Methode. Zur Fixierung der Dialysemembran im Nährboden wurde ein Noppenstempel entwickelt. Auf Grund der Untersuchungen können die in der DDR zur Zeit gültigen Sperrfristen für Eier nach erfolgter Antibiotikabehandlung bestätigt werden.

### Summary

Biological Inhibitor Test for Detection of Antibiotics in Hen's Egg  
Various test strains and culturing media were investigated for their suitability for biological detection of three antibiotics from hen's eggs and egg products, erythromycin, oxytetracycline, and penicillin. The agar perforation test, using a dialysis membrane, proved to be a suitable approach. Some sort of a knob stamp was developed for anchorage of the dialysis membrane in the culturing medium. These results confirmed the validity of valid GDR rules and regulations on embargo periods for eggs in the wake of antibiotic treatment.

Durch die Anwendung von Antibiotika bei Infektionskrankheiten in der Legehennenhaltung muß mit Antibiotikarückständen in den während und nach der Behandlung gelegten Eiern gerechnet werden.

Das Rückstandsverhalten der einzelnen Antibiotika ist abhängig von der Art des Arzneimittels, der Applikationsart und Dosis, der Verteilung, Bindung und Metabolisierung in den einzelnen Geweben des Tierkörpers und vom Ausscheidungsmechanismus. Für die Rückstandsbildung im Hühnerei sind die physiologischen Besonderheiten der Eibildung zu beachten. Auf Grund der Follikelreifung in unterschiedlichen Wachstumsstadien in Form einer Follikelhierarchie am Eierstock werden Fremdstoffe in unterschiedlicher Menge im Eidotter eingelagert (Anhalt u. Mitarb. 1976; Krieg 1966, 1972; Gylstorff 1968).

In der Frühphase der Dottorentwicklung aufgenommene medikamentelle Wirkstoffe werden zum Teil durch Rückverteilung wieder aus dem Dotter eliminiert und unterliegen außerdem durch das später einsetzende schnelle Wachstum des Dotters einer weiteren Verdünnung. In der Phase des schnellen Wachstums des Dotters in den letzten 10 d vor der Ovulation (bis 2 d vor dem Legedatum) werden mit der erhöhten Stoffaufnahme auch Fremdstoffe im Dotter eingelagert, die nicht wieder aus dem Dotter eliminiert werden. Hieraus resultiert eine längere Persistenz von Fremdstoffen im Eidotter nach Absinken des Serumblutspiegels. Im gereiften Follikel, im Stadium der präovulatorischen Ruhephase, werden infolge unterbrochener Vaskularisierung kaum noch Wirkstoffe im Dotter aufgenommen. Dagegen lassen sich Rückstände von Arzneimitteln, die während der letzten 48 h vor der Eiablage entsprechende Blutspiegelwerte aufwiesen, im Eiklar nachweisen. Da der Eileiter Reserveproteine für die Bildung des Eiklars von 2 Eiern enthält, sind im Eiklar letzte Wirkstoffgehalte etwa 1 d nach Erreichen des Nullwertes im Blutserum zu erwarten.

Probleme ergeben sich beim biologischen Hemmstoffnachweis durch den hohen Anteil unspezifischer Hemmstoffe im Eiklar. Diese sind makromolekulare Eiweißverbindungen, die während der Bebrütung des Eies den Embryo vor Infektionen durch eingedrungene Bakterien schützen sollen. Die in Tabelle 1 angeführten Eiweißstoffe sind bei der Infektionsabwehr im Eiklar von Bedeutung.

Durch die bakteriostatischen und bakteriziden Eigenschaften der Eiklarproteine ergeben sich im biologischen Hemmstoffnachweis unspezifische Hemmzonen, die den Nachweis von Arzneimittelnrückständen empfindlich stören.

Die Untersuchungen hatten den biologischen Rückstandsnachweis der Antibiotika Penicillin, Erythromycin und Oxytetracyclin im Ei zum Ziel und beinhalten die Ausschaltung unspezifischer Hemmstoffe im Eiklar, die Auswahl geeigneter Nachweisstämme und Nährmedien, den Nachweis zugesetzter Antibiotika in Eimasse in vitro sowie die Überprüfung festgelegter Karenzzeiten nach der Behandlung von Hühnern mit Antibiotika.

### Ausschaltung unspezifischer Hemmstoffe

#### Material und Methode

Je 40 Eiklarproben, 40 Eigelbproben und 20 Voleipproben von gesunden unbehandelten Tieren wurden homogenisiert und im Agarlochtest in ein Sporen-Agar-Gemisch (Peptonagar pH 6,8 mit Sporensuspension *Bacillus (Bac.) subtilis* ATCC 6633) pipettiert. Das Eimaterial wurde im rohen Zustand, im erhitzten Zustand (Probenerhitzung im Wasserbad bei 70 °C, Erhitzungsdauer für Eiklar 5, 10 und 15 min, für Eigelb und Volei 15 min) sowie im rohen Zustand unter Verwendung der Dialysemembran Nephrophan in den Nährboden verbracht. Die Auswertung erfolgte nach 18 h Bebrütung bei 37 °C.

Zur Fixierung der Dialysemembran im Nährboden wurde ein Noppenstempel aus Silikonkautschuk entwickelt, der eine optimale Diffusion durch die Dialysemembran gewährleistet.

Tabelle 1: Eiweißstoffe im Eiklar, die für die Infektionsabwehr von Bedeutung sind (Board 1969; Garibaldi 1960; Stadelmann 1977; Vadehra 1974).

Eiweißstoffe	% Gehalt am Proteinanteil des Eiklars	Wirkung
Lysozym	3,5	Zerstörung der Zellwandsubstanzen grampositiver Bakterien Fixierung u. Agglutination gramnegativer Bakterien im alkalischen Milieu
Conalbumin	13	Bindung von Eisen, Kupfer, Mangan, Zink
Ovomucoid	11	Bindung von Trypsin
Ovoinhibitor	0,1	Zerstörung der Protease von Pilzen
Avidin	0,05	Bindung von Biotin
Apoprotein	n. n.	Bindung von Riboflavin

<sup>\*)</sup> Dieser Beitrag ist Herrn Ob.-Vet.-Rat Prof. Dr. G. Scheibner, Berlin, zum 60. Geburtstag gewidmet.

und alle 4 Wochen auf frischem Schrägagar passagiert. Zur Charakterisierung der Feldstämme erfolgte eine Vordifferenzierung (Grob-differenzierung) mit folgenden Tests: Gramfärbung; Zytochromoxydase, Beweglichkeit im U-Röhrchen sowie Oxidations-Fermentations-Leistung (Hugh-Leifson-Medium). Im Anschluß an die Grobdifferenzierung wurden die isolierten Enterobakterien in weiteren 31 biochemischen Reaktionen mit dem Ziel der Zuordnung zu den einzelnen Species geprüft. Die Durchführung der biochemischen Methoden (lange Bunte Reihe) erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von Bergey (1984). Die Zubereitung der Medien und die biochemische Technik wurden nach Angaben des Institutes für Immunpräparate und Nährmedien sowie Hallmann u. Burckhardt (1974), Winkle (1979) und Linsert u. Mitarb. (1970) vorgenommen.

Zur Prüfung der *Enterobacteriaceae*-Stämme wurden sie auf 5% igem Hammelblutagar subkultiviert. Von diesen gewachsenen Kulturen passagierten wir jeweils mehrere Kolonien in 5 ml Dextrosebouillon, die den Ausgangspunkt zum Beimpfen der einzelnen Medien bildete. Zur Prüfung der Eigenschaften der Feld- und Teststämme waren, einschließlich verschiedentlich Wiederholungen, insgesamt 6000 Reaktionen erforderlich. Die Zuordnung der Feldstämme zu bestimmten Species erfolgte nach Bergey (1984).

Die Resistenzprüfung der gramnegativen Kulturen erfolgte auf L4-Agar als Diffusionstest mit dem Testbesteck des Human-Impfstoffproduktions- und Forschungsinstitutes Budapest. Von den 156 Stämmen wurden jeweils einige Kolonien (1 Öse) in 5 ml Nährbouillon übertragen und 4 h bei 37° C bebrütet. Mit Hilfe einer Pipette fertigten wir von dieser Suspension in 9,9 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnung von 1:100 an. Von dieser Verdünnung wurden 0,1 ml auf L4-Agar überführt und mit einem sterilen Glas-Spatel gleichmäßig ausgestrichen.

Als Wirkstoffe wurden die in der DDR am häufigsten gegen Mastitiden eingesetzten antibakteriellen Substanzen geprüft. Es handelte sich um Streptomycin, Oxytetracyclin, Neomycin, Penicillin und Sulfactomid. Für die serologische Untersuchung der isolierten *E. coli*-Stämme aus Mastitiden verwendeten wir die folgenden diagnostischen Koliseren vom Bezirksinstitut für Veterinärwesen Dresden: polyvalentes Schweinekoliserum, polyvalentes Kälberuhrserum, Kälbersepsisserum 078:K80 (B), Humankoliserum 02:KI sowie die Kälberseren 0101:K32 (CRR 354), 0101:K35 (CRR 19), 0101:L30 (CRR), 0101:K28 (CRR 252) und K99.

## Ergebnisse

### Vordifferenzierung der Feldstämme gramnegativer Bakterien

Die Tabelle 1 informiert über die Eingliederung der Bakterienstämme in Gattungen.

### Morphologische Besonderheiten der Kulturen

Von den 162 Kulturen wiesen die 147 *Enterobacteriaceae*-Stämme nach der Bebrütung (24 h bei 37°C) auf Blutagar keine wesentlichen Unterschiede in der Koloniemorphologie auf. Die 14 Kulturen *Acinetobacter* konnten während unserer Subkultivierungen nur bei einer Bebrütungstemperatur von 22°C (Zimmertemperatur) nach 24 bis 48 h angezüchtet werden. Diese Stämme bildeten auf den Platten sehr kleine feuchte Kolonien.

Tabelle 1. Ergebnisse der Vordifferenzierung von 162 Reinkulturen gramnegativer Stämme aus Mastitiden.

	Gram-färbung	Zytochromoxydase-reaktion	Glukose-spaltung	Beweglichkeit	Anzahl der Stämme
<i>Enterobacteriaceae</i>	—	—	F	d	147 = 90,74 %
<i>Pseudomonas</i>	—	+	O	+	1 = 0,62 %
<i>Acinetobacter</i>	—	—	—	—	14 = 8,64 %
insgesamt					162 = 100 %

O — oxydative Glukose-Spaltung; F — fermentative Glukose-Spaltung; d — unterschiedliches Verhalten

Von 147 auf Gassner-Agar isolierten *Enterobacteriaceae* zeigten 144 (97,96 %) eine positive Laktose-Reaktion. Bemerkenswert ist, daß 3 von 11 Enterobakterstämmen auf Gassner-Agar eine negative Laktose-Reaktion zeigten. Es handelte sich dabei um *Enterobacter agglomerans*. Bei Verwendung von Gassner-Agar reagierten alle *Acinetobacter*-Stämme negativ. Auf dem 5%igen Hammelblutagar verursachten nur 22 (10,26 %) *E. coli*-Stämme Hämolyse in unterschiedlicher Stärke.

### Biochemische Identifizierung der Stämme bis zur Species

Nach der Vordifferenzierung wurden 90,74 % der Kulturen als *Enterobacteriaceae* identifiziert und konnten aufgrund der 31 biochemischen Kriterien insgesamt 10 *Enterobacteriaceae*-Arten zugeordnet werden. In der Tabelle 2 sind sie zusammenfassend dargestellt.

### Resistenztest

Einen Überblick über die Verteilung der Wirkstoffempfindlichkeit der gramnegativen Stämme aus Mastitiden gibt die Tabelle 3.

### Objektträgeragglutination

Von den 117 *E. coli*-Stämmen reagierten insgesamt 39 % mit den polyvalenten Koliseren für Kälber und Schweine sowie dem Kolisepsisserum (Kälber) und dem Humankoliserum 02:KI. In einzelnen waren Reaktionen mit dem polyvalenten Koliserum (Schwein) am häufigsten vertreten (29 = 24,79 %). 20,51 % der Isolate wurden mit Kälberuhrserum typisiert, und 14 Stämme (11,97 %) wiesen eine Agglutination mit Kälbersepsisserum 078:K80 (B) auf. 24 weitere Stämme reagierten mit 02:KI positiv.

Mit den 4 monovalenten Kälberseren ließen sich von den 117 *E. coli*-Stämmen 16 (14 %) in verschiedene Serogruppen einordnen. Innerhalb dieser 16 Isolate wurden 11 mit den Antisera 0101:K32 (CRR 354) typisiert. Weiterhin ließen sich von den 16 genannten Stämmen 5 in die Serogruppe 09:K35 (CRR 19) und je 4 Stämme in die Serogruppen 0101:K30 (CRR) und 0101:K28 (CRR 252) einordnen. Keines der Isolate reagierte mit K-99 Antigen.

In den Ergebnissen ist enthalten, daß einige Stämme mit einem oder mehreren Seren gleichzeitig agglutinierten. Von der Gesamtzahl der untersuchten 117 Stämme zeigten 47 % keine Agglutination.

Tabelle 2. Häufigkeitsverteilung der *Enterobacteriaceae*-Arten aus Eutersekreten von Mastitiden.

	Anzahl der Kulturen absolut	Anzahl der Kulturen in Prozent
<i>E. coli</i>	117	72,22
<i>E. agglomerans</i>	111	6,79
<i>E. cloacae</i>	2	1,23
<i>E. intermedium</i>	1	0,62
<i>Citrobacter diversus</i>	2	1,23
<i>Klebs. pneumonia</i>	3	1,85
<i>Serratia marcescens</i>	2	1,23
<i>Serratia odorifera</i>	2	1,23
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,62
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	0,62
nichtdifferenzierte Kulturen	5	3,09
insgesamt	247	90,74

*E.* — *Escherichia*; *Klebs.* — *Klebsiella* (gilt auch für Tab. 3 und 4)

## Ergebnisse

Bei unbehandelten Proben ohne Dialysemembran waren Hemmzonen meßbar:

Eiklarproben Hemmzonenbreite 3 bis 4 mm bei allen Proben, Eigelbproben Hemmzonenbreite 1 mm bei 30 % der Proben, Volleiproben Hemmzonenbreite 1 bis 3 mm bei allen Proben.

Durch Erhitzung der Proben auf 70°C war nach 5 und 10 min Erhitzungszeit nur eine teilweise Inaktivierung der Hemmsubstanzen zu beobachten, nach 15 min Erhitzungszeit traten keine Hemmzonen mehr auf. Durch Einsatz einer Dialysemembran waren Hemmzonen der unbehandelten Proben um den Agarlochtest nur diesseits der Dialysemembran zu beobachten, jenseits der Dialysemembran traten keine Hemmzonen auf.

Bei Verwendung anderer Keimarten zum Hemmstoffnachweis traten im Eiklar teilweise auch jenseits der Dialysemembran unspezifische Hemmzonen auf; bei *Bac. cereus* var. *mycoides* SG 756 wurden Hemmzonen bis 1 mm, bei *Bac. subtilis* BGA bis 2 mm und bei *Sarcina* (*Sarc.*) *lutea* UEM 7/63 ebenfalls bis 2 mm jenseits der Dialysemembran gemessen.

Als ungeeignet für die angewandte Methode der Abtrennung großmolekularer Stoffe durch die Dialysemembran erwies sich *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953; bei diesem Stamm wurden bei der Eiklaruntersuchung Hemmhöfe bis zu 7 mm jenseits der Dialysemembran gemessen.

## Auswahl geeigneter Nachweisstämme und Nährmedien

### Material und Methode

Von den Antibiotika Benzylpenicillin-Natrium, Erythromycinbase und Oxytetracyclindihydratbase wurden Phosphatpufferverdünnungsreihen hergestellt, die im Agarlochtest in Testmedien (Bakterien- bzw. Sporen-Agar-Gemisch) pipettiert und nach 1 h Vordiffusion und 18 h Bebrütung bei 30°C durch Messung der Hemmzonenbreite ausgewertet wurden.

Folgende Nachweisstämme und Nährmedien wurden geprüft:

Benzylpenicillin-Natrium:

*Bac. subtilis* BGA pH 6,0  
*Sarc. lutea* ATCC 9414 pH 6,0

*Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 pH 7,2

*Sarc. lutea* UEM 7/63 pH 6,0

Erythromycinbase:

*Sarc. lutea* ATCC 9414 pH 8,0

*Bac. subtilis* BGA pH 8,0

Oxytetracyclindihydratbase:

*Bac. cereus* var. *mycoides* SG 756 pH 6,0

*Bac. subtilis* BGA pH 6,0

*Bac. subtilis* ATCC 6633 pH 6,8

Verwendete Nährmedien:

Peptonagar nach TGL 24 705 Bl. 2 pH 6,8

Peptonagar entsprechend der Verfügung vom

20. 7. 1988 zur Untersuchung von lebenden

Schlachttieren sowie von Fleisch für den Export

auf Hemmstoffrückstände (unveröffentlichter

Teil)

Müller-Hinton-Agar pH 6,0 und pH 8,0

pH 7,2

## Ergebnisse

Bei der Prüfung auf ihre Empfindlichkeit gegen Antibiotikaverdünnungen in Phosphatpuffer zeigten die einzelnen Teststämme folgende Nachweisgrenzen (Hemmzonenbreite zwischen 1 bis 3 mm):

Benzylpenicillin-Natrium:

*Bac. subtilis* BGA pH 6,0 0,025 IE/ml,

*Sarc. lutea* ATCC 9414 pH 6,0 0,025 IE/ml,

*Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 pH 7,2 0,0032 IE/ml,

*Sarc. lutea* UEM 7/63 pH 6,0 0,0125 IE/ml;

Erythromycinbase:

*Sarc. lutea* ATCC 9414 pH 8,0 0,025 µg/ml,

*Bac. subtilis* BGA pH 8,0 0,05 µg/ml;

Oxytetracyclindihydratbase:

*Bac. cereus* var. *mycoides* SG 756 pH 6,0 0,3 µg/ml,

*Bac. subtilis* BGA 6,0 pH 0,3 µg/ml,

*Bac. subtilis* ATCC 6633 pH 6,8 0,2 µg/ml.

Der zum Penicillinnachweis als empfindlichster Stamm ermittelte *Bac. stearothermophilus* erwies sich leider für die Untersuchungen von Eimaterial nach der angewandten Methode

Tabelle 2. Eiweißbindung der Antibiotika im Untersuchungsmaterial (Wiederfindungsversuche) – arithmetische Mittelwerte der Hemmzonenbreiten in mm und Wiederfindungsrate in %.

Verdünnungsstufe	Standardverdünnung Phosphatpuffer	Eiklar mm	%	Eigelb mm	%	Vollei mm	%	Eipulver mm	%
Teststamm: <i>Sarc. lutea</i> UEM 7/63									
Benzylpenicillin-Natrium									
0,1 IE/ml	10,8	11,8	109	10,8	100	10,8	100	10,0	93
0,05 IE/ml	7,4	9,3	126	8,0	108	7,8	105	7,0	95
0,025 IE/ml	5,3	7,3	138	5,0	94	5,0	94	2,5	47
0,0125 IE/ml	2,8	3,5	125	2,5	89	2,3	82	0,5	18
0,0063 IE/ml	0	1,3		0		0		0	
Teststamm: <i>Sarc. lutea</i> ATCC 9414									
Erythromycinbase									
0,4 µg/ml	8,9	7,6	85	6,6	74	6,1	69	6,5	73
0,2 µg/ml	7,6	6,1	80	4,3	57	4,8	63	4,5	59
0,1 µg/ml	5,7	4,1	72	2,4	42	3,0	53	2,5	44
0,05 µg/ml	3,2	3,0	94	0,1	3	0,9	28	0,5	16
0,025 µg/ml	1,1	0,9	82	0		0			
0,0125 µg/ml	0	0		0		0			
Teststamm: <i>Bac. cereus</i> var. <i>mycoides</i> SG 756									
Oxytetracyclindihydratbase									
1,0 µg/ml	5,8	5,4	93	3,6	62	4,6	79	4,6	79
0,8 µg/ml	4,3	4,1	95	2,0	47	3,4	79	3,5	81
0,6 µg/ml	3,8	3,9	103	1,6	42	2,6	68	3,0	79
0,4 µg/ml	3,3	2,4	73	0,5	15	1,4	4,2	0,5	15
0,2 µg/ml	0,5	0		0		0		0	
0,1 µg/ml	0	0		0		0		0	

Tabelle 3. Nachweisempfindlichkeit der Stämme in Phosphatpuffer und Eimaterial.

Antibiotikum	Teststamm	Phosphat-puffer-standard	nachgewiesene Empfindlichkeit				WHO-Forderung Vollei
			Eiklar	Eigelb	Vollei	Vollei-pulver	
Benzylpenicillin-Na	<i>Sarc. lutea</i>	0,0125	0,0125	0,0125	0,125	0,025	0,03
	UEM 7/63	IE/ml	IE/ml	IE/ml	IE/ml	IE/ml	IE/ml
Erythromycinbase	<i>Sarc. lutea</i>	0,025	0,05	0,1	0,1	0,1	0,3
	ATCC 9414	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml
Oxytetracyclindihydratbase	<i>Bac. cereus</i>	0,3	0,4	0,7	0,5	0,5	0,3
	var. mycoides SG 756	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml	$\mu$ /ml

wegen großer unspezifischer Hemmhöhe auch jenseits der Dialysemembran als ungeeignet.

### Prüfung der Eiweißbindung (Wiederfindungsversuche)

#### Material und Methode

Verdünnungsreihen der Antibiotika wurden in Eiklar, Eigelb, Volleimasse sowie aufgelöstem Volleipulver hergestellt. Hier erfolgte eine pH-Korrektur zum Nachweis von Penicillin und Oxytetracyclin im Eiklar und in Volleimasse mit 1 n HCl auf pH 6,0 und zum Nachweis von Erythromycin im Eigelb mit 1 n NaOH auf pH 8,0. Zur Prüfung der Eiweißbindung wurden die mit Antibiotika versetzten Eimassen 30 min einer Schüttelbehandlung und weitere 30 min einer Bebrütung bei 37 °C unterzogen. Parallel zu den Antibiotikaverdünnungen in Eimasse wurden Standardverdünnungen in Phosphatpufferlösung gleicher Konzentration ausgesetzt. Beide Ansätze wurden in ein Nährboden-Testkeimgemisch mit Dialysemembran verimpft, nach 1 h Vordiffusion 18 h bei 30 °C bebrütet und anschließend ausgewertet.

#### Ergebnisse

Die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche sind in Tabelle 2 enthalten.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß im Eigelb eine stärkere Bindung der Antibiotika an Eiweiße erfolgte als im Eiklar. Diese Tendenz war in den Versuchen mit Oxytetracyclin und Erythromycin deutlich ausgeprägt, beim Penicillin nur in geringem Maße. Im Vollei erfolgte die Eiweißbindung entsprechend den Anteilen von Eigelb und Eiklar. Die Bindung an die Eiweiße stieg bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen, während bei höheren Antibiotikakonzentrationen die Wiederfindungsrate größer war.

Aus den Wiederfindungsversuchen ergab sich die in Tabelle 3 angegebene Nachweisempfindlichkeit der Stämme für das jeweilige Antibiotikum im Eimaterial.

### Nachweis von Rückständen in Eiern behandelter Tiere

#### Material und Methode

Die Antibiotika Aviapien, Erythromycin-Pulver 20 und Ursocyclin-Pulver 20 wurden oral mit der Knopfsonde an Legehennen verabreicht, die Tagesdosis wurde in 2 gleichen Einzeldosen appliziert. Von allen anfallenden Eiern ab 1. Behandlungstag bis zum Vorliegen von mindestens 3 negativen Gelegen nach der Behandlung wurden Eiklar und Eigelb getrennt im Agarlochtest mit Dialysemembran mit jeweils 2 empfindlichen Nachweiststämmen auf Hemmstoffrückstände untersucht.

#### Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse der Eier behandelter Tiere sind in Tabelle 5 aufgelistet

Tabelle 4. Orale Applikation von antibiotikahaltigen Arzneimitteln.

Arzneimittel	Tagesdosis	Behandlungsdauer
Aviapien	0,025 g Arzneimittel/kg Körpermasse $\pm$ 10 000 IE/kg Körpermasse	4 d
Erythromycin-Pulver	0,15 g Arzneimittel/kg Körpermasse $\pm$ 0,03 g Erythromycinbase/kg Körpermasse	3 d
Ursocyclin-Pulver	0,5 g Arzneimittel/kg Körpermasse $\pm$ 0,1 g OTC/kg Körpermasse	5 d

OTC – Oxytetracyclin

### Diskussion

Bei der Untersuchung von Eimaterial auf Antibiotikarückstände mit dem biologischen Hemmstoffnachweis müssen unspezifische, das Bakterienwachstum hemmende Substanzen, die insbesondere im Eiklar vorhanden sind, zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen ausgeschaltet werden. Möglichkeiten dazu sind in der Erhitzung des Untersuchungsmaterials auf 70 °C für 15 min oder durch Verwendung einer Dialysemembran gegeben. Da bei der Erhitzung des Untersuchungsmaterials mit Wirkungsverlusten der Antibiotika gerechnet werden muß und da die durch Erhitzung bedingte Koagulation des Eimaterials die Diffusion in den Nährboden erschwert, ist die Verwendung einer Dialysemembran im Nährboden das Mittel der Wahl. *Bac. stearothermophilus* war für diese Untersuchungsmethode als Teststamm wegen breiter unspezifischer Hemmzonen auch jenseits der Dialysemembran ungeeignet. Mit allen anderen verwendeten Teststämmen war eine eindeutige Auswertung möglich, da jenseits der Dialysemembran durch unspezifische Hemmstoffe nur schmale Hemmzonen unterhalb des als positiv zu wertenden Bereiches (2 mm) beobachtet wurden.

Die in der Literatur (Anhalt u. Mitarb. 1976; Krieg 1966, 1972; Gylstorff 1968) benannten besonderen Ausscheidungsmechanismen von Fremdstoffen über das Hühner können anhand der eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Rückstände der untersuchten Antibiotika wurden während der Behandlung stets zuerst im Eiklar nachgewiesen, über das Eigelb erfolgte die Ausscheidung verzögert. Eine Antibiotikaausscheidung über das Eiklar konnte maximal bis zum 3. d nach der Behandlung nachgewiesen werden, während über das Eigelb Rückstände bis maximal 6 d nach der Behandlung nachweisbar waren.

Tabelle 5. Ergebnisse der Untersuchungen von Eiern behandelter Tiere auf Hemmstoffrückstände.

Aviapien															Summe der positiven Proben	
Versuchstag:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
Tag nach Beendigung der Arzneimittelverabreichung:					1	2	3	4	5	6						
Zahl der untersuchten Eier	11	13	11	14	13	10	13	11	8	8					12 13 4 5	
Zahl der positiven Proben																
Eiklar <i>Sarc. lutea</i> UEM	0	2	1	7	2	0	0	0	0	0						
Eiklar <i>Bac. subtilis</i> BGA	0	1	3	5	4	0	0	0	0	0						
Eigelb <i>Sarc. lutea</i> UEM	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0						
Eigelb <i>Bac. subtilis</i> BGA	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0						
Erythromyzin-Pulver 20															40 6 60 1	
Versuchstag:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Tage nach Beendigung der Arzneimittelverabreichung:					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
Zahl der untersuchten Eier	14	12	15	9	12	16	6	15	15	10	13	14	15	13		
Zahl der positiven Proben																
Eiklar <i>Sarc. lutea</i> ATCC 9414	0	12	15	9	4	0	0	0	0	—	—	—	—	—		
Eiklar <i>Bac. subtilis</i> BGA	2	4	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—		
Eigelb <i>Sarc. lutea</i> ATCC 9414	0	1	10	9	9	13	6	11	1	0	0	0	0	0		
Eigelb <i>Bac. subtilis</i> BGA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ursocyclin-Pulver 20															45 14 5	
Versuchstag:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
Tage nach Beendigung der Arzneimittelverabreichung						1	2	3	4	5	6	7				
Zahl der untersuchten Eier	17	16	16	16	14	10	16	13	10	7	11	13				
Zahl der positiven Proben																
Eiklar <i>Bac. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	0	0	12	13	6	10	1	3	0	0	0	0				
Eigelb <i>Bac. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	0	0	0	0	0	6	5	2	1	0	0	0				
Eigelb <i>Bac. subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0				

Tabelle 6. Sperrfristen für Eier von Hühnern, die mit Antibiotika behandelt wurden.

antibiotikahaltiges Arzneimittel	Nachweis im Versuch nach der letzten Behandlung	Sperrfrist für Eier nach der letzten Behandlung
Aviapien	1 d	1 d
Erythromyzin-Pulver 20	6 d	9 d
Ursocyclinpulver 20	4 d	4 d

Die Wiederfindungsversuche ergaben bei allen untersuchten Antibiotika eine stärkere Eiweißbindung im Eigelb, während im Eiklar höhere Wiederfindungsraten zu beobachten waren. Die von Scholtan (1968) beschriebene stärkere Eiweißbindung von Antibiotika bei niedrigen Konzentrationen des Arzneimittels und die höhere Wiederfindungsrate durch erhöhten Anteil an freien Antibiotika bei stärkeren Konzentrationen des Arzneimittels können durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Die relativ starken Schwankungen der Einzelwerte können durch ungleichmäßige Verteilung der Antibiotika im Eimaterial oder durch die geringe Anzahl der Einzeluntersuchungen (die angegebenen Werte sind Mittelwerte von jeweils 8, bei Penicillin von jeweils nur 4 Untersuchungsreihen) bedingt sein. Als geeignete Nachweistämme für Rückstände in Eiern können auf Grund der Untersuchungen empfohlen werden:

#### Penicillinrückstände

Empfohlene Teststämme:

*Bac. subtilis* BGA,  
*Sarc. lutea* UEM 7/63.

In Phosphatpuffer erwies sich *Sarc. lutea* UEM 7/63 als empfindlicher, in den Ausscheidungsversuchen wurde jedoch mit *Bac. subtilis* BGA eine geringgradig höhere Anzahl positiver Proben ermittelt. Beide Stämme können zum Nachweis eingesetzt werden.

Empfohlener pH-Wert des Nachweismediums: pH 6,0.

#### Erythromyzinrückstände

Empfohlener Teststamm:

*Sarc. lutea* ATCC 9414.

Der im Ausscheidungsversuch zum Vergleich eingesetzte *Bac. subtilis* BGA erwies sich als wenig empfindlich. Empfohlener pH-Wert des Nachweismediums: pH 8,0.

#### Oxytetracyclinrückstände

Empfohlener Teststamm:

*Bac. cereus* var. *mycoides* SG 756.

Der zum Vergleich eingesetzte Stamm *Bac. subtilis* ATCC 6633 wies zwar in den Versuchen mit Phosphatpuffer eine höhere Nachweisempfindlichkeit als *Bac. cereus* auf, aber im Ausscheidungsversuch konnte mit ihm nur eine wesentlich geringere Anzahl positiver Proben ermittelt werden. Empfohlener pH-Wert des Nachweismediums: pH 6,0.

Auf Grund der Rückstandsuntersuchungen der Eier behandelter Tiere können die zur Zeit für Eier gültigen Sperrfristen bei Einhaltung der vorgeschriebenen Dosierung als gerechtfertigt angesehen werden.

#### Literatur

1. Anhalt, G., Wenzel, S., Conrad, P. (1976): Modelluntersuchungen zur Rückstandsbildung im Hühnerfleisch nach therapeutischer Verabreichung antibakteriell wirksamer Substanzen, Arch. Lebensmittelhygiene 27, 201. — 2. Board, R. G. (1969): The microbiology of the hen's egg. Appl. Microbiol. 11, 245. — 3. Garibaldi, J. A. (1960): Factors in egg white which control growth of bacteria. Food. Res. 25, 337. — 4. Gylstorff, I. (1968): Die Therapie beim Geflügel unter Berücksichtigung des Konsumenten von Geflügelfleisch und Eiern. Arch. Geflügelkd. 32, 400. — 5. Krieg, Renate (1966): Der Sulfonamidgehalt in Eiern, Blut und Organen von Weißem Leghorn während und nach einer Behandlung mit dem Sulfonamid Sulmet, 1. Mitteilung: Der Sulfonamidgehalt in

den Eiern von Weißem Leghorn. Arch. Geflügelkd. 30, 299. – 6. Krieg, Renate (1972): Der Übergang von Furazolidon in das Ei bei therapeutischer Anwendung. Arch. Geflügelkd. 36, 171. – 7. Scholtan, W. (1968): Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Plasmas und der Gewebsflüssigkeit. Antibiotica et Chemotherapeutica-Fortschritte. Verlag S. Karger, Basel. – 8. Stadelmann, W. J. (1977): Egg Proteins.

in: Graham, H. D. – Food Colloids Westport, C. C. N. N., Avi Publish, Co. – 9. Vadehra, D. V. (1974): Eggs. in Smith, L.; Loc, W.; Minov, L. J. – Food Service Science Westport Avi Publish Comp. Inc.

Verfasser: Dr. Gerlinde Steiner, Haferbreiter Weg 132–135, Stendal, 3500

Mh. Vet.-Med. 45 (1990): 386–390  
VEB Gustav Fischer Verlag Jena

Sektion Tierproduktion und Veterinärmedizin der Karl-Marx-Universität Leipzig, Wissenschaftsbereich Mikrobiologie und Tierseuchen (Leiter: Ob.-Vet.-Rat Prof. Dr. sc. H. Liebermann)

## Differenzierung gramnegativer Bakterien, insbesondere Enterobakterien, aus Mastitiden von Rindern mit makroskopisch veränderten Sekreten

Von A. Bergmann und O. Alkaff

Kode: Rinder, Mikrobiologie, Diagnostik, Enterobakterien, Mastitiden

Mit einer Abbildung (Angenommen am 5. Juli 1989)

### Zusammenfassung

Es wurden 162 gramnegative Kulturen untersucht, die in mindestens mittelgradigen Gehalten aus Mastitiden mit makroskopisch veränderten Sekreten stammten. Nach Vordifferenzierung erwiesen sich 147 als Enterobakterien, 14 als *Acinetobacter* und eine als *Pseudomonas*. Mit Hilfe von 31 biochemischen Kriterien konnten die Enterobakterien-Stämme 10 Arten zugeordnet werden. *Enterobacter intermedium*, *Citrobacter diversus*, *Serratia odorifera* und *Kluyvera cryocrescens* sowie die Gattung *Acinetobacter* wurden dabei erstmals aus Mastitissekreten von Rindern isoliert und aus den insgesamt etwa 6000 ausgeführten Testreaktionen 17 Leitkriterien zur Differenzierung von Enterobakterien aus Mastitissekreten erarbeitet. In der antibiotischen Empfindlichkeitsprüfung mit 5 Wirkstoffen, die in der DDR am häufigsten zur Behandlung von Mastitiden eingesetzt werden, zeigten die Antibiotika Neomycin und Oxytetracyclin eine gute Wirksamkeit in vitro gegen *Escherichia (E.) coli*. Bei den anderen differenzierten Enterobakterien lautet die Reihenfolge Neomycin, Streptomycin und Oxytetracyclin. Von den *E. coli*-Stämmen agglutinierten 53 % mit den verfügbaren Routineseren.

### Summary

Differentiation of Gram-Negative Bacteria, especially Enterobacteria, from Mastitis in Cattle with Macroscopically Altered Secretion  
Investigations were performed on 162 gram-negative cultures of which at least medium levels had originated from mastitis with macroscopically altered secretion. Pre-differentiation showed 147 cultures to be enterobacterial, 14 acinetobacter, and one pseudomonas. The enterobacterial strains were assigned to ten species, using 31 biochemical criteria. *Enterobacter intermedium*, *Citrobacter diversus*, *Serratia odorifera*, *Kluyvera cryocrescens*, and the *acinetobacter* genus had been isolated for the first time from mastitis secretions of cattle. About 6,000 test reactions were run, with 17 criteria being derived from them for differentiation of enterobacteria. Five active substances most commonly used in the GDR for mastitis treatment were tested for their antibiotic potentiality. Neomycin and oxytetracycline exhibited good in vitro effectiveness on *Escherichia (E.) coli*. The antibiotic sensitivity of the other differentiated enterobacteria was found to be in the following order: neomycin, streptomycin, and oxytetracycline. Agglutination with available routine sera was recorded from 53 percent of the *E. coli* strains.

Euterentzündungen durch Enterobakterien, insbesondere durch *Escherichia (E.) coli*, nehmen international einen vorderen Platz im Spektrum der Mastitisserreger ein und ziehen die Aufmerksamkeit durch ihren oft akuten Verlauf auf sich. Im ätiologischen Spektrum der Mastitiden der Rinder in der DDR nehmen Enterobakterien, insbesondere *E. coli* mit etwa 5 bis 13 % im Verlauf der Jahre, den 4. Platz (nach den Streptokokken außerhalb der Gruppe B, Galtstreptokokken und Staphylokokken) in der Häufigkeit ein.

Nachdem in den vergangenen über 50 Jahren für das Territorium der DDR keine ausführliche Differenzierung von gramnegativen Keimen aus Rindermastitiden veröffentlicht wurde, umfaßt die Zielstellung der vorliegenden Untersuchungen zunächst die Differenzierung gramnegativer Stämme aus Rindermastitiden verschiedener Regionen der DDR. Die untersuchten Stämme wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen die in der DDR zur Behandlung von Mastitiden am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe geprüft. Bakterienstämme, welche zu *E. coli* gehören, sollten mit den in der Routinediagnostik zur Verfügung stehenden Antiseren agglutiniert werden.

### Material und Methode

Auf Anforderung übersandten uns Milchhygiene-Abteilungen der Bezirksinstitute für Veterinärwesen 162 gramnegative Bakterienstämme.<sup>1)</sup> Es handelte sich um Reinkulturen, die in mindestens mittelgradigen Gehalten aus Mastitiden mit makroskopisch veränderten Sekreten von Rindern isoliert wurden. Im Fall der Isolate aus dem Bezirksinstitut für Veterinärwesen Dresden erhielten wir Kulturen, deren Phagozytose im Milchsedimentpräparat mikroskopisch nachgewiesen war.

Die Entnahme der Eutersekretproben in den Milchviehanlagen erfolgte entsprechend den Vorschriften der Arbeitsanweisung „Milchprobenentnahme im Rahmen der Herdenuntersuchungen“ vom 1. 4. 1985. Die Reinkulturen sind in Schrägagarröhrchen bis höchstens etwa 30 h per Post transportiert worden.

Als Teststämme fungierten insgesamt 19 Vertreter der Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Yersinia* und *Proteus*. Sämtliche Teststämme überprüften wir u. a. zur Testung unserer Medien in der Bunten Reihe. Die Feld- und Teststämme wurden auf Hammelblutagar in Röhrchen als Schrägagarkultur bei Kühlschranktemperatur um 3°C aufbewahrt.



## Weitere Erfahrungen mit der Abgrenzung lysozymbedingter unspezifischer Reaktionen im allgemeinen Hemmstofftest

Von G. van der Wall

Aus dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Braunschweig  
Leiter: Veterinärdirektor Dr. Heinert

Im Nachgang zu unserer o. a. Mitteilung geben wir hier noch einige Ergebnisse bekannt, welche wir in der Zwischenzeit bei der Durchführung des Hemmstofftestes und des von uns beschriebenen Differenzierungsverfahrens beobachten konnten. Zunächst versuchten wir abzuklären, ob und in welchem Umfang auch bei anderen Tierarten als dem Schwein lysozymbedingte Lysishöfe auf den Subtilisplatten Hemmhöfe vortäuschen und somit eine Fehlbeurteilung verursachen könnten. In dieser Versuchsreihe wurden wiederum nur Nieren getestet, weil nur bei diesen bislang störende Lysozymreaktionen zu beobachten waren. Die Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

1. RIND (Bulle, Färse, Fresser, Kuh):	130 Nieren
a) davon ohne Lysozym:	29
davon mit Hemmstoffen:	1
b) mit Lysozym:	101
davon mit Reaktion auf Subtilis:	2
mit Lysozym und Hemmstoffen:	13
2. KALB:	105 Nieren
a) davon ohne Lysozym:	81
davon mit Hemmstoffen:	3
b) mit Lysozym:	24
davon mit Reaktion auf Subtilis:	—
mit Lysozym und Hemmstoffen:	—
3. PFERD:	60 Nieren
a) davon ohne Lysozym:	—
b) mit Lysozym:	60
davon mit Reaktion auf Subtilis:	11
mit Lysozym und Hemmstoffen:	6
4. SCHAF:	27 Nieren
a) davon ohne Lysozym:	4
davon mit Hemmstoffen:	—
b) mit Lysozym:	23
davon mit Reaktion auf Subtilis:	—
mit Lysozym und Hemmstoffen:	—

Hieraus ergibt sich, daß bei Pferden stets mit dem Vorhandensein von Lysozym zu rechnen ist und in relativ hohem Anteil auch auf den Subtilisplatten geringe lysozymbedingte Lysishöfe auftreten können – unseren Erfahrungen nach in Bereichen, die gelegentlich auch zu einer Beanstandung führen könnten (bis 3 mm). Rinder- und Kälbernieren erwiesen sich ebenfalls in hohem Maße als lysozymhaltig, jedoch waren bei Rindern nur gelegentlich Lysozymaktivitäten auf den Subtilisplatten zu beobachten und bei Kälbern gar keine; Fehlbeurteilungen infolge Lysozymwirkung sind somit bei dieser Tierart kaum zu befürchten.

Die untersuchten Schafsnieren erzeugten in 1/4 der getesteten Fälle Lysozymaktivitäten auf Micrococcus-Agar, in keinem Falle jedoch auch auf Subtilisagar; eine Störung der Beurteilung des Hemmstofftestes dürfte aus diesem Grunde bei dieser Tierart somit kaum zu erwarten sein.

Im Rahmen dieser Testreihe konnten wir auch in Muskelproben Lysozymaktivitäten beobachten; weil bei der Untersuchung von Muskulatur auf Hemmstoffe bislang jedoch noch keine Schwierigkeiten durch unspezifische Reaktionen auftraten, wurde der Lysozymgehalt in Muskelproben nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß Pferdenieren regelmäßig die Nieren von Rindern, Kälbern und Schafen häufig Lysozym enthalten; lysozymbedingte falsch-verdächtige bzw. falsch-positive Hemmstoffreaktionen sind auf Grund unserer Beobachtungen jedoch nur gelegentlich bei Pferden und vielleicht auch einmal beim Rind zu erwarten. Wenn auch die uns zur Verfügung stehende Probenzahl von Pferde- und Schafsnieren beschränkt war, lassen die eindeutigen Testergebnisse doch obige Schlußfolgerungen zu.

Die Differenzierung von echten Hemmstoffen und Lysozym bereitete auch weiterhin nach der beschriebenen Methodik keine Schwierigkeiten, es konnte bei Einsatz von Dialysemembran und Micrococcus-Agar i. R. auf die Elektrophorese verzichtet werden. Letztere wird nur noch dann eingesetzt, wenn eine Bestimmung, um welche Art antibiotischer Substanzen es sich handeln könnte, erforderlich erscheint.

Als Dialysemembran verwenden wir jetzt Cellophan P 325/1 der Firma Pütz GmbH + Co., Postfach 26, 6204 Taunusstein 4. Dieses Material läßt sich leicht handhaben, ist preiswert und läßt bei Anwendung der beschriebenen Methodik im Rahmen des allgemeinen Hemmstofftestes u. E. eine sichere Abtrennung zwischen Antibiotica und Nieren-Lysozym zu. Es ist dies dieselbe Folie, wie sie auch von Forschner und Glende\*) verwendet wurde.

Die im Rahmen früherer Untersuchungen getroffene Feststellung, daß Subtilis pH 6 infolge spärlichen Keimwachstums für die Elektrophorese nicht geeignet sei, kann nicht weiterhin aufrechterhalten werden. Weitere Untersuchungen haben zu der Erkenntnis geführt, daß gewisse Alterungsprozesse der Subtilis-Kulturen uns seinerzeit zu jenen Ergebnissen kommen ließen.

Ich danke meinen Mitarbeitern, die mir bei vorstehenden Untersuchungen technische Hilfe gaben.

### Summary

Kidneys of horses regularly contain Lysozyme, while the kidneys of cattle, calves and sheep contain it frequently. False positive or false suspected reactions of inhibitory substances due to Lysozyme are occasionally expected for horses, for cattle only exceptionally.

"Cellophan P 325/1" of the firm Pütz + Co., P.O. Box 26, D-6204 Taunusstein 4, is suggested as dialyse-membrane. Fresh Subtilis-cultures should be used for the determination of antibiotics by electrophoresis.

(siehe: Lysozym – Ursache von unspezifischen Reaktionen im mikrobiologischen Hemmstofftest. Arch. Le.-Hyg. 27 [1976], 55–60).

Anschrift des Verfassers: Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Dresdenstraße 6, 3300 Braunschweig.

\*) Forschner, E. u. W. Glende (1976): Die Schweineniere als Problemorgan beim biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft 56, 226–28.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**